

17682.6t  
[Signature]

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
21 de Octubre de 2004 (21.10.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2004/089068 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: A01H 5/00,  
5/10, 1/06

DE AGRICULTURA SOSTENIBLE, CONSEJO SUPE-  
RIOR INVESTIG. CIENTÍFICAS, Alameda del Obispo  
s/n Apdo 4084, E-14004 Córdoba (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2004/070019

(22) Fecha de presentación internacional:  
7 de Abril de 2004 (07.04.2004)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,  
para toda clase de protección nacional admisible): AE,  
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,  
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,  
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P 200300859 10 de Abril de 2003 (10.04.2003) ES

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,  
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO  
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,  
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid  
(ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): VE-  
LASCO VARO, Leonardo [ES/ES]; INSTITUTO DE  
AGRICULTURA SOSTENIBLE, CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, Alameda del  
Obispo s/n, APDO 4084, E-14004 Córdoba (ES). FER-  
NÁNDEZ MARTÍNEZ, José, M. [ES/ES]; INSTITUTO

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección  
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al  
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: SUNFLOWER SEEDS WITH HIGH DELTA-TOCOPHEROL CONTENT

(54) Título: SEMILLAS DE GIRASOL CON ALTO CONTENIDO EN DELTA-TOCOFEROL

(57) Abstract: The present invention relates to sunflower seeds which have been genetically modified through two artificial induction cycles of mutations followed in each case by processes for the identification of mutant individuals which have the desired character. The disclosed seeds are characterized in that they contain between 26 % and 80 % of the tocopherols as delta-tocopherol. This high delta-tocopherol production is determined by the genotype of the seeds which have been modified to this effect, and is always obtained independently of the culture conditions, thereby obtaining an inheritable character. Today, sunflower seeds producing such high levels of delta-tocopherol do not exist. Genetically modified sunflower plants which produce through self-fertilization seeds with high delta-tocopherol levels and the oil with high natural delta-tocopherol concentration, extracted from the seeds, are also objectives of the present invention.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a semillas de girasol modificadas genéticamente a través de dos ciclos de inducción artificial de mutaciones seguidos en cada caso por procesos de identificación de individuos mutantes que poseen el carácter deseado. Estas semillas se caracterizan por poseer entre el 26% y el 80% de los tocoferoles en forma de delta-tocopherol. Esta elevada producción de delta-tocopherol esta determinada por el genotipo de las semillas, que ha sido modificado con este objetivo, y se produce siempre con independencia de las condiciones de cultivo, tratándose por tanto de un carácter heredable. No existen en la actualidad semillas de girasol que produzcan niveles de delta-tocopherol tan elevados. Las plantas de girasol modificadas genéticamente que al ser autofecundadas producen semillas con niveles elevados de delta-tocopherol y el aceite con elevada concentración natural de delta-tocopherol extraído de sus semillas constituyen asimismo objetos de la presente invención.

WO 2004/089068 A1

## TÍTULO

Semillas de girasol con alto contenido en delta-tocoferol

## SECTOR DE LA TÉCNICA

- 5 La invención se enmarca en el sector de la agricultura, tratándose de semillas con elevado contenido en delta-tocoferol. El aceite extraído de las semillas posee una gran estabilidad oxidativa y es óptimo para usos alimentarios e industriales (biocombustibles y lubricantes). Este aceite y sus subproductos pueden emplearse para extracción de
- 10 farmacéutica.

## ESTADO DE LA TÉCNICA

- Los tocoferoles son los principales compuestos naturales con propiedades antioxidantes presentes en los aceites de semillas. Al ser liposolubles, pasan al aceite durante el
- 15 proceso de extracción y ejercen una importante actividad antioxidante, tanto en el aceite envasado como en los alimentos que contienen aceite vegetal (F.B. Padley y col., 1994; Occurrence and characteristics of oils and fats. En *The Lipid Handbook*, ed. F.D. Gunstone, J.L. Harwood y F.B. Padley, London: Chapman & Hall, pp 47-223). De los cuatro tipos de tocoferoles que existen (alfa-, beta-, gamma-, y delta-tocoferol), la
- 20 máxima actividad antioxidante in vitro, es decir, fuera del organismo humano, corresponde a beta-, gamma-, y delta-tocoferol, mientras que alfa-tocoferol presenta una actividad in vitro notablemente inferior a los otros tres tocoferoles (G. Pongracz y col., Tocopherole, Antioxidanten der Natur. *Fat Science and Technology* 97: 90-104, 1995).
- 25 Las semillas de girasol estándar presentan una fracción de tocoferoles dominada por alfa-tocoferol, que representa aproximadamente el 95% del total de tocoferoles, estando el resto constituido por beta-tocoferol y gamma-tocoferol, que se encuentran presentes en proporciones inferiores al 5% del total de tocoferoles (F.B. Padley y col., 1994, obra citada). Debido a la predominancia de alfa-tocoferol en las semillas de girasol, su aceite
- 30 presenta una menor protección frente a la oxidación que otros aceites vegetales extraídos a partir de semillas que contienen mayores proporciones de beta-, gamma-, y/o delta-tocoferol, que ejercen una mayor actividad antioxidante in vitro. La Tabla 1 presenta la composición en tocoferoles de los principales aceites de semillas.

Tabla 1

Composición media en tocoferoles en los principales aceites de semillas

Aceite	% Tocoferol			
	Alfa	Beta	Gamma	Delta
Algodón	43	2	55	0
Cacahuete	44	2	52	2
Colza	26	9	64	1
Cártamo	90	8	2	0
Girasol	95	4	1	0
Lino	1	0	99	0
Maíz	20	3	73	4
Ricino	6	6	23	65
Soja	6	1	66	27

La predominancia de alfa-tocoferol en las semillas de girasol es prácticamente universal, habiéndose descrito únicamente cuatro líneas de girasol que presentan niveles modificados de tocoferoles, y que se pueden agrupar en dos clases:

- 5 a) Alto contenido en gamma-tocoferol. Se trata de dos líneas que poseen más del 85% de los tocoferoles en forma de gamma-tocoferol, siendo el resto alfa-tocoferol. Una de ellas, denominada LG-17, fue desarrollada en Rusia (Y. Demurin, Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds, *Helia* 16:59-62, 1993), mientras que la segunda fue desarrollada en España y se denominó T2100 (L. Velasco y col., Registration of T589 and T2100 sunflower germplasms with modified tocopherol profiles, Crop Science, en prensa).
- 10 b) Contenido medio en beta-tocoferol. Se trata de dos líneas que poseen entre el 30% y el 50% de los tocoferoles de la semilla en forma de beta-tocoferol, siendo el resto alfa-T. Una de ellas, denominada LG-15, fue desarrollada en Rusia (Y. Demurin, 1993, obra citada), mientras que la segunda, denominada T589, fue desarrollada en España (L. Velasco y col., en prensa, obra citada).
- 15
- 20

Mediante cruzamiento entre las líneas LG-15 y LG-17, investigadores rusos y yugoslavos obtuvieron recombinantes con niveles ligeramente elevados de delta-tocoferol, siendo el máximo nivel obtenido de este tocoferol del 25% de todos los tocoferoles presentes en la semilla (Y. Demurin y col. Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality. Plant Breeding 115:33-36, 1996). En resumen, los niveles máximos de tocoferoles individuales que existen hoy día en semillas de girasol son:

- 95% alfa-tocoferol (composición natural)
- 50% beta-tocoferol
- 10   ▪ 95% gamma-tocoferol
- 25% delta-tocoferol

#### EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Uno de los objetos de la presente invención son las semillas de girasol con alto contenido en delta-tocoferol, que presentan entre el 26% y el 80% del total de tocoferoles en forma de delta-tocoferol, y los siguientes contenidos de otros tocoferoles: entre el 0.5% y el 45% del total de tocoferoles en forma de alfa-tocoferol; entre el 0% y el 60% del total de tocoferoles en forma de beta-tocoferol; entre el 0% y el 70% del total de tocoferoles en forma de gamma-tocoferol. Algunas de estas semillas presentan un contenido en delta-tocoferol siempre superior al 50%, 65% y 75% del total de tocoferoles en las semillas. El carácter de alto contenido en delta-tocoferol de las semillas de girasol es heredable (al ser autofecundadas) y se expresan de forma estable, independientemente de las condiciones ambientales.

25   Constituye otro objeto de la presente invención el aceite de girasol extraído de estas semillas, por cualquier procedimiento, y que presenta de forma natural, sin ningún tipo de adición externa, un alto contenido en delta-tocoferol (26-80% del total de los tocoferoles en forma de delta-tocoferol).

30   Asimismo constituye otro objeto de la presente invención las plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) que al ser autofecundadas producen semillas que presentan un elevado contenido en delta-tocoferol (26-80% del total de los tocoferoles).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un germoplasma de girasol (*Helianthus annuus* L.) caracterizado por poseer un elevado contenido de delta-tocoferol en las semillas. Este tocoferol representa entre el 26% y el 80% del total de tocoferoles en las semillas. Estos elevados niveles de delta-tocoferol no son producidos en la naturaleza por plantas de girasol y ha sido obtenido mediante un proceso complejo consistente en dos ciclos de inducción artificial de mutaciones seguidos de identificación de plantas mutantes y fijación del carácter mutado. El elevado contenido en delta-tocoferol objeto de la presente invención es heredable y se produce siempre con independencia de las condiciones de cultivo.

Para la obtención de las plantas modificadas genéticamente cuyas semillas poseen una elevada concentración de delta-tocoferol, se ha llevado a cabo un largo proceso de mejora genética dirigido a alterar genéticamente la ruta biosintética de tocoferoles. Este proceso ha consistido en cuatro etapas: (1) Inducción de mutaciones artificiales en semillas de una variedad estándar de girasol; (2) Identificación de individuos con alteraciones en la ruta biosintética de tocoferoles producto de las mutaciones inducidas y fijación de los caracteres mutados; (3) Nuevo proceso de inducción de mutaciones artificiales sobre individuos que ya presentaban un primer nivel de alteración en la ruta de biosíntesis de tocoferoles; (4) Identificación de individuos con alteraciones en la ruta biosintética de tocoferoles diferentes a las alteraciones que presentaban los individuos de partida, seguida de fijación del nuevo carácter mutante.

El primer proceso de mutagénesis o inducción artificial de mutaciones consistió en el tratamiento de semillas de una variedad estándar de girasol con un producto con propiedades mutagénicas, esto es, capaz de inducir mutaciones en el ADN de la planta. Debido a la baja frecuencia de mutaciones esperables en los genes responsables de la ruta biosintética de los tocoferoles tras el tratamiento mutagénico, éste fue seguido de un proceso de análisis no destructivo de la composición en tocoferoles en varios miles de semillas individuales.

Para que las mutaciones detectadas resulten de utilidad comercial, deben ser heredables y deben expresarse con independencia de las condiciones ambientales en las que se

cultivan las plantas. Por este motivo, se realizó un proceso de selección conducente a fijar los caracteres mutantes y a verificar su estabilidad bajo diferentes condiciones ambientales. Tras este proceso, varias de las mutaciones inicialmente detectadas fueron descartadas, mientras que un mutante con elevado contenido en gamma-tocoferol (95% del total de los tocoferoles presentes en las semillas) fue fijado. Este mutante, denominado IAST-1, demostró responder a una base genética diferente a la que poseen otras líneas con elevado contenido en gamma-tocoferol. Así, mientras que los cruzamientos de las líneas LG-17 y T2100 con líneas de composición estándar en tocoferoles producen progenies F<sub>2</sub> que no segregan para niveles intermedios de gamma-tocoferol (Demurin y col., obra citada; L. Velasco y J.M. Fernández-Martínez, Identification and genetic characterization of new sources of beta- and gamma-tocopherol in sunflower germplasm, Helia, en prensa), las progenies F<sub>2</sub> procedentes de cruces entre el mutante IAST-1 y líneas de composición estándar en tocoferoles segregaron ampliamente para niveles intermedios de gamma-tocoferol.

Tras el aislamiento genético del mutante IAST-1, se realizó un segundo proceso de mutagénesis sobre semillas de este mutante, con el objetivo de generar variación adicional para niveles elevados de otros tocoferoles. Este segundo ciclo de mutagénesis estuvo asimismo seguido de un proceso analítico a gran escala para identificación de mutantes, así como de un proceso de fijación de mutantes y confirmación de su expresión con independencia de las condiciones de cultivo. En este segundo ciclo de mutagénesis se identificó y fijó el mutante objeto de la presente invención, que se caracteriza porque sus semillas contienen elevadas concentraciones de delta-tocoferol, comprendidas entre el 26% y el 80% del total de tocoferoles en las semillas. Esta elevada proporción de delta-tocoferol en las semillas es un carácter heredable y se expresa de forma estable independientemente de las condiciones de cultivo de las plantas.

## MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

### *Primer ciclo de mutagénesis*

Semillas de girasol de la variedad población Peredovik, con una composición en tocoferoles en las semillas consistente en 96% alfa-tocoferol, 3% beta-tocoferol, y 1%  
5 gamma-tocoferol, se embebieron durante 4 horas en agua destilada, a una temperatura de 20 °C. Pasado este tiempo, las semillas se transfirieron a una solución del agente mutagénico metilsulfonato de etilo (EMS) con una concentración 70 mM en tampón fosfato 0.1M a pH 7.0 durante 2 horas, manteniendo una agitación constante de 60 rpm. Tras el tratamiento mutagénico, las semillas (generación M<sub>1</sub>) se lavaron durante 16  
10 horas con agua corriente y posteriormente se sembraron en el campo.

Las plantas M<sub>1</sub> se cosecharon individualmente y sus semillas (generación M<sub>2</sub>) se analizaron individualizadamente para composición en tocoferoles mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), siguiendo el protocolo desarrollado por  
15 F. Goffman y col. (Quantitative determination of tocopherols in single seeds of rapeseed [*Brassica napus* L.]. *Fett/Lipid* 101:142-145, 1999). De un total de 1080 plantas M<sub>1</sub> analizadas, una de ellas presentó segregación para niveles elevados de gamma-tocoferol, con un máximo contenido de 95% de los tocoferoles totales en forma de gamma-tocoferol. Semillas con estos niveles de gamma-tocoferol produjeron plantas que  
20 expresaron el carácter uniformemente. Al cruzar plantas procedentes de semillas con 95% de gamma-tocoferol con plantas de variedades estándar de girasol, se observó una amplia segregación para contenido en gamma-tocoferol en semillas F<sub>2</sub>, que incluyó niveles de gamma-tocoferol intermedios entre ambos parentales. Esta segregación tan amplia fue completamente inesperada, debido a que materiales con niveles similares de  
25 gamma-tocoferol desarrollados previamente (Demurin y col., obra citada; L. Velasco y J.M. Fernández-Martínez, obra citada) no habían producido segregación para niveles intermedios de gamma-tocoferol tras ser cruzadas con variedades estándar de girasol. El mutante así obtenido se denominó IAST-1.

### 30 *Segundo ciclo de mutagénesis*

Semillas de girasol del mutante IAST-1, con una composición en tocoferoles en las semillas consistente en 5% alfa-tocoferol y 95% gamma-tocoferol, se embebieron durante 4 horas en agua destilada, a una temperatura de 20 °C. Pasado este tiempo, las

semillas se transfirieron a una solución del agente mutagénico azida sódica con una concentración 4 mM en tampón 0.1 M citrato sódico a pH 3.0 durante 2 horas, manteniendo una agitación constante de 60 rpm. Tras el tratamiento mutagénico, las semillas (generación M<sub>1</sub>) se lavaron durante 16 horas con agua corriente y  
5 posteriormente se sembraron en el campo.

Las plantas M<sub>1</sub> se cosecharon individualmente y sus semillas (generación M<sub>2</sub>) se analizaron individualizadamente para composición en tocoferoles mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), siguiendo el protocolo desarrollado por  
10 F. Goffman y col. (obra citada). De un total de 1240 plantas M<sub>1</sub> analizadas, una de ellas presentó segregación para niveles elevados de delta-tocoferol, con un máximo contenido de 55% de los tocoferoles totales en forma de delta-tocoferol. Semillas con estos niveles de delta-tocoferol produjeron plantas que expresaron el carácter uniformemente, con concentraciones de delta-tocoferol comprendidas entre el 26% y el  
15 80% del total de tocoferoles presentes en las semillas. Estos niveles se mantuvieron en sucesivas generaciones. La nueva línea mutante de girasol cuyas semillas producen niveles de delta-tocoferol comprendidos entre el 26% y el 80% del total de tocoferoles se denominó LAST-3.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Semillas de girasol con alto contenido en delta-tocoferol, caracterizadas porque poseen entre el 26% y el 80% del total de tocoferoles en forma de delta-tocoferol.
- 5 2.- Semillas de girasol con alto contenido en delta-tocoferol según la reivindicación 1, caracterizadas porque presentan los siguientes contenidos de otros tocoferoles: entre el 0.5% y el 45% del total de tocoferoles en forma de alfa-tocoferol; entre el 0% y el 60% del total de tocoferoles en forma de beta-tocoferol; entre el 0% y el 70% del total de tocoferoles en forma de gamma-tocoferol.
- 10 3.- Semillas de girasol con alto contenido en delta-tocoferol según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizadas porque el contenido en delta-tocoferol es siempre superior al 50% del total de tocoferoles en las semillas.
- 15 4.- Semillas de girasol con alto contenido en delta-tocoferol según la reivindicación 3, caracterizadas porque el contenido en delta-tocoferol es siempre superior al 65% del total de tocoferoles en las semillas.
- 20 5.- Semillas de girasol con alto contenido en delta-tocoferol según la reivindicación 4, caracterizadas porque el contenido en delta-tocoferol es siempre superior al 75% del total de tocoferoles en las semillas.
- 25 6.- Semillas de girasol con alto contenido en delta-tocoferol según las reivindicaciones 1-5, caracterizadas porque al ser sometidas a cualquier procedimiento de extracción de aceite producen un aceite que contiene entre un 26% y un 80% de delta-tocoferol.
- 30 7.- Semillas de girasol con alto contenido en delta-tocoferol según las reivindicaciones 1-6, caracterizadas porque expresan de forma estable al ser autofecundadas la característica de alto contenido en delta-tocoferol, independientemente de las condiciones ambientales

8.- Aceite de girasol extraído mediante cualquier procedimiento a partir de semillas de girasol con alto contenido en delta-tocoferol según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque posee de forma natural, sin ningún tipo de adición externa, un contenido natural en delta-tocoferol entre 26% y 80% de los tocoferoles totales.

5

9.- Plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) que al ser autofecundadas producen semillas que presentan un elevado contenido en delta-tocoferol, según las reivindicaciones 1-7.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/070019

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**Int. cl7** A01H 5/00, 5/10, 1/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**Int. cl7** A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/10380 A1 (UNIVERSITY OF NEVADA) 02.03.2000, <b>the whole document</b>	1-9
A	FR 2778527 A1 (RHONE POULENC AGRO Société anonyme) 19.11.1999, <b>the whole document</b>	1-9
A	DEMURIN, Y. et al.: "Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality", Plant Breeding, 1996, vol. 115, n° 1, pp.: 33-36, ISSN: 0179-9541, <b>the whole document</b>	1-9
A	VELASCO, L. et al.: "Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids", J. Agric. Sci., 2002, vol. 139, n° 4, pp.: 425-429, ISSN:0021-8596, <b>the whole document</b>	1-9
A	ES 2082717 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.03.1996, <b>the whole document</b>	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 June 2004 (24.06.04)

Date of mailing of the international search report

9 July 2004 (09.07.04)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2004/070019

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0010380 A	02.03.2000	CA 2340857 A AU 5786199 A EP 1107662 A EP 19990945207 ZA 200101561 A CN 1324211 T BR 9913329 A JP 2002525038 T US 6448475 B	02.03.2000 14.03.2000 20.06.2001 25.08.1999 17.09.2001 28.11.2001 15.01.2002 13.08.2002 10.09.2002
FR2778527 A	19.11.1999	NONE	
ES 2082717 AB	16.03.1996	WO 9520313 A CA 2181261 A AU 1705495 A EP 0741511 AB EP 19950908894 ES 2095800 AB HU 75362 A BG 100734 A AU 706751 B EP 0934692 AB EP 19990200403 DE 69511844 D DE 69511844 T RU 2147407 C BG 62751 B US 6410831 B RO 117746 B US 6486336 B DE 69528672 D US 2002184673 A PT 934692 T US 2003084481 A DE 69528672 T BR 9506659 A	03.08.1995 03.08.1995 15.08.1995 13.11.1996 31.01.1995 16.02.1997 28.05.1997 29.08.1997 24.06.1999 11.08.1999 31.01.1995 07.10.1999 16.12.1999 20.04.2000 31.07.2000 25.06.2002 30.07.2002 26.11.2002 28.11.2002 05.12.2002 28.02.2003 01.05.2003 12.06.2003 07.10.2003

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ES 2004/070019

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> A01H 5/00, 5/10, 1/06

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>7</sup> A01H

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	WO 00/10380 A1 (UNIVERSITY OF NEVADA) 02.03.2000, todo el documento.	1-9
A	FR 2778527 A1 (RHONE POULENC AGRO Société anonyme) 19.11.1999, todo el documento.	1-9
A	DEMURIN, Y. et al.: "Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality", Plant Breeding, 1996, vol. 115, n° 1, pp.: 33-36, ISSN: 0179-9541, todo el documento.	1-9
A	VELASCO, L. et al.: "Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids", J. Agric. Sci., 2002, vol. 139, n° 4, pp.: 425-429, ISSN:0021-8596, todo el documento.	1-9
A	ES 2082717 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.03.1996, todo el documento.	1-9

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

24 Junio 2004 (24.06.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

09 JUL 2004 09.07.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

A. Maquedano Herrero

Nº de teléfono + 34 91 3495474

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/070019

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0010380 A	02.03.2000	CA 2340857 A AU 5786199 A EP 1107662 A EP 19990945207 ZA 200101561 A CN 1324211 T BR 9913329 A JP 2002525038 T US 6448475 B	02.03.2000 14.03.2000 20.06.2001 25.08.1999 17.09.2001 28.11.2001 15.01.2002 13.08.2002 10.09.2002
FR2778527 A	19.11.1999	NINGUNO	—
ES 2082717 AB	16.03.1996	WO 9520313 A CA 2181261 A AU 1705495 A EP 0741511 AB EP 19950908894 ES 2095800 AB HU 75362 A BG 100734 A AU 706751 B EP 0934692 AB EP 19990200403 DE 69511844 D DE 69511844 T RU 2147407 C BG 62751 B US 6410831 B RO 117746 B US 6486336 B DE 69528672 D US 2002184673 A PT 934692 T US 2003084481 A DE 69528672 T BR 9506659 A	03.08.1995 03.08.1995 15.08.1995 13.11.1996 31.01.1995 16.02.1997 28.05.1997 29.08.1997 24.06.1999 11.08.1999 31.01.1995 07.10.1999 16.12.1999 20.04.2000 31.07.2000 25.06.2002 30.07.2002 26.11.2002 28.11.2002 05.12.2002 28.02.2003 01.05.2003 12.06.2003 07.10.2003